



厦门大学学报(自然科学版)

Journal of Xiamen University(Natural Science)

ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目：以寨卡病毒 NS3 解旋酶为靶点的海洋天然产物库的虚拟筛选与成药性评价
作者：曾志平
收稿日期：2019-04-30
网络首发日期：2019-08-22
引用格式：曾志平. 以寨卡病毒 NS3 解旋酶为靶点的海洋天然产物库的虚拟筛选与成药性评价. 厦门大学学报(自然科学版).
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20190821.1803.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

以寨卡病毒 NS3 解旋酶为靶点的海洋天然产物库的虚拟筛选与成药性评价

曾志平

(厦门大学药学院, 福建省药物新靶点研究重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要 寨卡病毒病自 2015 年在巴西等南美洲爆发后, 已经成为影响全球公共卫生的重大问题, 但目前仍无特效药可以治疗寨卡病毒病。运用基于结构的药物虚拟筛选技术, 以寨卡病毒 NS3 解旋酶的两个最新报道的结合位点为对接口袋, 通过海洋天然产物库进行分子对接, 初步得到了 Divanchrobactin、Bromophenol、2-hydroxy-1'-methylzeatin、Garveatin E、aromatic polyketides、dimeric terestrols 等 10 个化合物, 它们能很好地靶向寨卡病毒 NS3 解旋酶, 从而可能成为潜在治疗寨卡病毒病的海洋天然产物。同时, 利用薛定谔软件套装中的 ADMET 预测模块对结合较好的化合物展开初步的成药性评价, 发现除了 Divanchrobactin 有较严重的成药性问题外, 所有的化合物均能满足药物开发的基本要求, 这为后期的实验研究提供了理论基础。

关键词 寨卡病毒病; NS3 解旋酶; 海洋天然产物; 虚拟筛选; ADMET 预测模块

中图分类号 R914.2

文献标志码 A

DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.201904039

Virtual screening and druggability prediction of Marine natural product library targeted by NS3 helicase of Zika virus

ZENG Zhiping

(Fujian Provincial Key Laboratory of Innovative Drug Target Research, School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract Since the outbreak of Zika virus disease in Brazil and other South America in 2015, it has become a concerned issue affecting global public health, but there is still no FDA-approved drug to treat Zika virus disease until now. According to the novel two binding sites of NS3 helicase, our established marine natural products were docked into each binding site respectively by Glide. Virtual screening results show that Divanchrobactin, Bromophenol, 2-hydroxy-1'-methylzeatin, Garveatin E, aromatic polyketides, dimeric terestrols etc could have a good binding pattern towards NS3 helicase and hence could be developed as a potential hit for the treatment of Zika virus disease. Meanwhile, the ADMET prediction module in the Schrodinger software set was used to carry out a preliminary evaluation of the druggability of our selected marine compounds, and it was found that all the compounds could satisfy the basic requirements of drug property except Divanchrobactin, which provided a theoretical basis for the later experimental verification.

Key words Zika virus disease; NS3 helicase; marine natural product; virtual screening; ADMET prediction module

寨卡病毒是一种虫媒病毒, 于 1947 年从非洲乌干达寨卡森林中的恒河猴上分离而命名; 虽然致死率较低, 但 2015 年在巴西爆发寨卡病毒疫情后, 人们发现孕妇如果在怀孕期间感染寨卡病毒, 可能会导致新生儿发生小头畸形而影响后期的发育(已超 4000 例)^[1]。除此之外, 近期研究表明: 它还跟成人的格林-巴利综合征^[2]、急性脊髓炎^[3]、眼葡萄膜炎^[4]及脑膜炎^[5]等疾病密切相关。更为严重的是, 2017 年《Science》杂志报道寨卡病毒容易变异, 使其更具有攻击性及毒性, 从而在未来可能对人类的公共卫生安全构成较大的隐患^[6]。另一方面, 由于人类对寨卡病毒基础研究的滞后, 迄今为止, 仍没有相关治疗寨卡病毒病的药物上市, 因此, 如何开发一类治疗寨卡病毒病的药物成为了紧

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2018J01133); 厦门大学校长基金(20720180052)

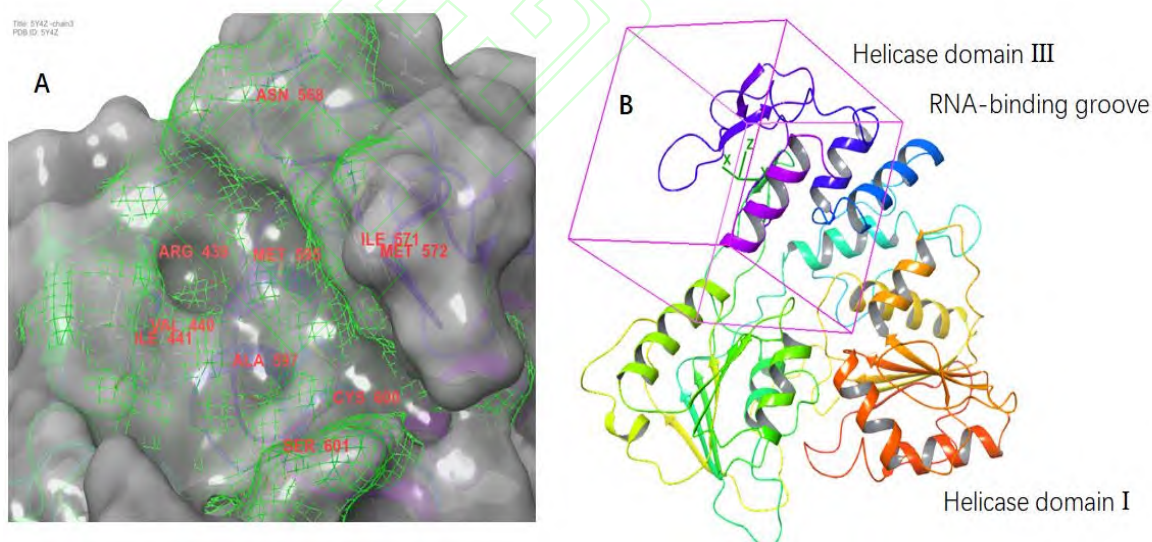
英文作者简介: Email: zengzhiping@xmu.edu.cn

网络首发时间: 2019-08-22 09:08:05 网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20190821.1803.002.html>

迫的课题^[7]。

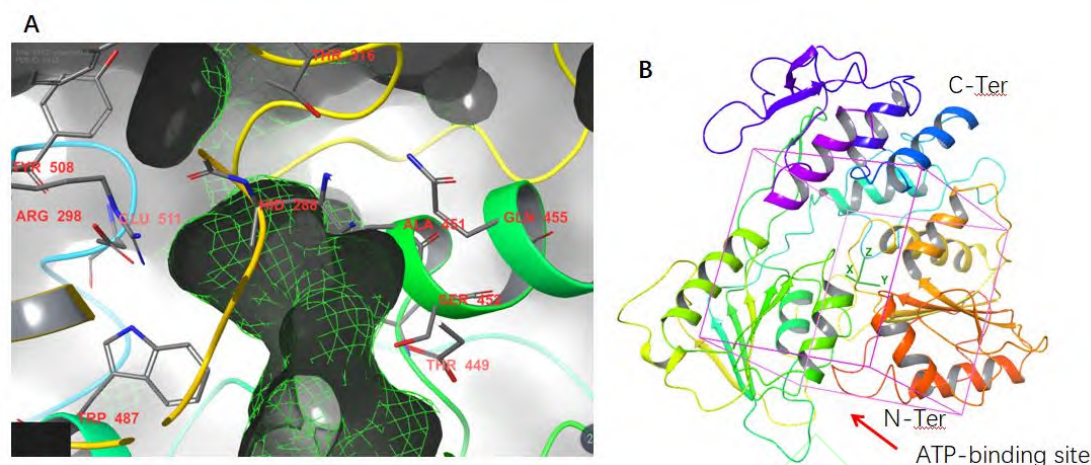
寨卡病毒是由 11 kb 的碱基组成的一类 RNA 病毒, 编码为 3419 个氨基酸, 后经过水解, 可以得到以下几种蛋白: 衣壳蛋白 (Capsid)、包膜蛋白 (Envelope), M 蛋白及具有功能的 NS1、NS2A、NS2B、NS3 蛋白水解酶、NS3 解旋酶、NS4、NS4B、NS5 甲基转移酶及 NS5 聚合酶等^[7]。除了 M 蛋白、NS2A、NS4 和 NS4B 外, 其他蛋白都有大量的晶体数据报道。其中随着 NS2B-NS3 蛋白水解酶^[8, 9]、NS3 解旋酶^[10]及 NS5 甲基转移酶^[11]等结构的解析, 基于晶体结构的药物虚拟筛选也相继出现^[12-16], 但目前都没有得到令人兴奋的结果。2017 年报道的 PrM 蛋白上的 139 位的丝氨酸变为天冬酰胺可能会导致病毒攻击性增强, 值得庆幸的是除此之外, 寨卡病毒并未发生变异, 这可能跟现在仍没有药物治疗寨卡病毒病相关。因为 NS3 解旋酶在寨卡病毒基因组的复制及病毒 RNA 的合成过程中, 发挥重要的作用, 因此, 成为了治疗寨卡病毒病的重要靶点。

NS3 解旋酶主要由三个结构域组成。目前, 基于 NS3 解旋酶两个经典口袋 (RNA 结合位点 (如图 1B) 以及 ATP 结合位点 (如图 2B)) 的药物虚拟筛选已经有人报道。最近, 比利时科学家 Sergei V. Strelkov 利用碎片库及核磁共振等手段最近发现了两个可供药物结合的新口袋^[17] (如图 1 和 2), 受到了广泛的关注; 口袋 A 是一个表面结合口袋, 它对于 NS3 解旋酶与 NS5 聚合酶两个病毒蛋白的相互作用起到非常重要的调控作用; 如果有化合物占据此口袋, 可能使二者的相互作用消失, 从而影响了病毒复制复合体的形成, 从而抑制了病毒的复制。口袋 B 位于 NS3 解旋酶三个结构域的交叉点, 是一个柔性但高度保守的变构调节口袋, 使 NS3 解旋酶的结构具有动态性; 而小分子在口袋 B 的结合将会使 NS3 解旋酶构象稳定在一个特定的构象, 从而有可能损害 NS3 解旋酶的正常功能。所以, 口袋 A 和口袋 B 成为了全新的调控 NS3 解旋酶生物学活性的重要口袋^[17]。本论文将对这两个新颖的结合口袋进行药物的虚拟筛选研究, 以期找到结合 NS3 解旋酶新位点的海洋天然产物。海洋天然产物由于其化学结构的多样性, 越来越受到药物化学家的青睐^[18-20]。本研究拟对寨卡病毒的 NS3 解旋酶蛋白的两个新颖的结合口袋开展海洋天然产物的筛选分析, 并对得到的结合较好的海洋天然产物进行初步的成药性分析, 为寻找治疗寨卡病毒病的化合物提供新的思路。



(A) 口袋 A 的表面结合部分及重要氨基酸; (B) 口袋 A 的位置示意图。

图 1 NS3 解旋酶的结构生物学与口袋 A 的位置
Fig. 1 Structure biology of NS3 Helicase and the position of Site A



(A) 口袋 B 的结合口袋及重要氨基酸；(B) 口袋 B 的位置示意图。

图 2 NS3 解旋酶的结构生物学与口袋 B 的位置
Fig. 2 Structure biology of NS3 Helicase and the position of Site B

1 研究方法

1.1 蛋白准备与结合口袋分析

比利时的 Strelkov 教授虽然在《International Journal of Molecular Sciences》杂志上发表了 NS3 解旋酶的两个新颖的结合口袋^[17]，但这两个与碎片分子结合的核磁结构尚未上传到蛋白质晶体数据库 (PDB) 提供下载；因此，本研究拟采用文献^[17]中讨论的口袋 (口袋 A (图 1) 和口袋 B (图 2)) 附近的关键氨基酸来定义分子对接中所需要的格点盒子 (Grid Box) 的位置，并用自己构建的海洋天然产物的分子结构在此口袋进行打分评估。从蛋白质晶体数据库 (PDB) 根据 PDB ID: 5Y4Z 下载到 NS3 解旋酶的晶体结构^[21]，并用薛定谔软件中的蛋白质准备模块 (Protein Preparation Wizard) 进行蛋白的预处理，如除去晶体水分子，加上氢原子，我们在 pH = 7.0 下用 PROPKA 程序计算每个氨基酸侧链的质子化状态；然后用薛定谔软件自带的 OPLS3e 力场及 impref 脚本进行蛋白质复合物的结构优化，除去不合理的碰撞接触等。

1.2 配体准备

5969 个海洋天然产物库的初步数据来源为海藻代谢物数据库 (Seaweed Metabolite Database, <http://www.swmd.co.in/>)、UNPD 天然产物数据库中的海洋来源小分子 (Universal Natural Products Database (UNPD), <http://pkuxxj.pku.edu.cn/UNPD>) 及《中华海洋本草-海洋天然产物》^[33]等。前两个数据库的分子为直接导入到薛定谔软件套装并进行三维结构转换；而《中华海洋本草-海洋天然产物》的化合物，我们先用 ChemDraw 构建二维结构分子，再用 Chem3D 把二维结构分子转为三维结构分子，优化的力场参数为 MM2。对于搜集到的分子最后用配体准备模块 (LigPrep) 优化计算，后重新化合物编码，依次命名为 MNPD000001~MNPD005969。

1.3 口袋 A 和口袋 B 结合口袋的成药性分析

用薛定谔软件套装的 Sitemap2.3 模块，对口袋 A 和口袋 B 的结合口袋进行了口袋成药性分析。以 siteA-1 及 siteB-3 两个 NMR 测定的小分子为结合口袋区域；配置参数为：Site Point 的个数设置为最少 15 个；对疏水相互作用采用更加严格的条件算法，同时用经典的格点文件进行计算。

1.4 分子对接过程与分析

基于口袋 A 的分子对接分析：以口袋 A 覆盖的 10 个重要氨基酸 (Arg439、Val440、Ile441、Asn568、Ile571、Met572、Met595、Ala597、Cys600、Ser601) 为关键氨基酸 (图 1A)，首先定义这些氨基酸的坐标中心为分子对接口袋的中心；同时，定义格点盒子 (Grid Box) 形状为立方体，大小为 20 Å，用受体格点文件程序 (Receptor Grid Generation) 产生格点文件。为了提高虚拟筛选的效

率,我们拟采用薛定谔软件中的 HTVS、SP 及 XP 模块进行逐级筛选。HTVS 与 SP 的打分函数(GlideScore)一样,但 HTVS 算法会通过降低寻找配体的构象数来加速对接的过程。而 XP 的打分函数比 HTVS 与 SP 的要更精细(主要增加了配体与受体的去溶剂化惩罚项等,从而降低虚拟筛选过程中的假阳性率),并充分考虑了配体与受体口袋的性状补偿等等,因此,将耗费较长的计算时间。对于本项目,我们拟用 HTVS 算法对 5969 个海洋天然产物小分子库进行初步筛选;对于得到的前 200 个化合物,进一步用 SP 方法进行中等精度的筛选。最后,对于排名前 50 个小分子化合物,再利用高等精度的 XP 筛选并分析结果。所有筛选方法如无提及均采用默认参数。比利时的 Strelkov 教授论文^[17]中的碎片分子 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物也作为参照物进行 XP 分子对接。

基于口袋 B 的分子对接分析:以口袋 B 覆盖的 14 个重要氨基酸包括 Val191、Ala287、His288、Arg298、Phe314、Thr316、Glu413、Thr449、Ala451、Ser452、Gln455、Trp487、Tyr508 和 Glu511(如图 2A);关于格点盒子(Grid Box)的产生及参数设置,对接的过程方法跟口袋 A 的方法完全一致。比利时的 Strelkov 教授论文^[17]中的碎片分子 N-(4-氯乙基)胍甲酰胺也作为参照物进行 XP 分子对接。

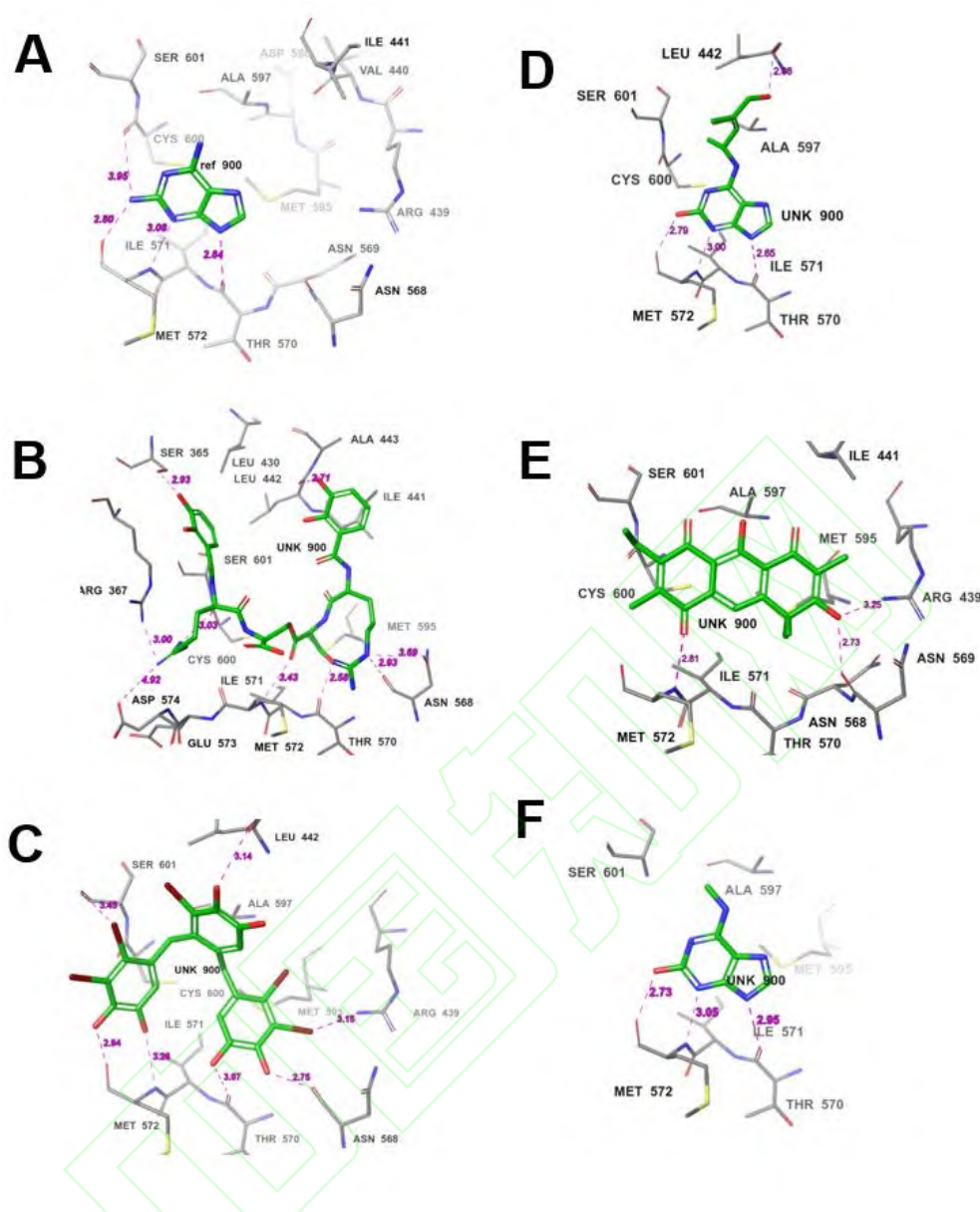
1.5 海洋天然产物的吸收、分布、代谢、排泄及毒性预测分析

在薛定谔软件中 QikProp v5.7 模块下采用正常模式对 10 个化合物进行了基于配体的 ADMET 预测(Ligand-Based ADME/Tox Prediction);QikProp v5.7 主要是根据 95%已经上市的药物进行模型训练,同时也对 30 个可能导致假阳性的反应官能团进行了注释,几乎满足了对成药性的评价要求。对筛选得到的十个海洋天然产物进行成药性评估,计算的描述符及参数主要包括:经典的成药五规则(donor HB、acceptHB、SASA 及 PSA 等)、药物代谢能力评价#metab、药物透皮吸收能力评价 QPPCaco 以及药物心脏毒性 QPlogHERG 等。

2 结果与分析

2.1 基于口袋 A 的虚拟筛选结果分析

口袋 A 位于寨卡病毒 NS3 和 NS5 蛋白的交界处,是蛋白蛋白相互作用的重要区域;该配体结合位点浅,属于一个表面结合位点(图 1);根据 Sitemap 模块的计算结果表明:口袋成药性计算参数如 Sitescore、Dscore 及 Size 均不如 Site B,这可能口袋 A 属于一个比较浅的口袋,倾向于表面结合同时缺少一个稳固的疏水口袋相关。虽然如此,此位点却在病毒复制复合体的形成过程中占有非常重要的作用,其中 Asn569 如果突变为 Ala,则病毒复制复合体无法形成,从而停止了病毒 RNA 的复制与传染;而此位点在寨卡病毒及登革热病毒等黄病毒属中高度保守。同样地,高度保守的碱性强极性氨基酸 ARG439 可以通过降低溶剂可极化表面来介导 NS3 解旋酶与其他蛋白相互作用。除此之外,形成口袋 A 的边界非极性氨基酸如 ILE571、ILE441、ALA597 同样也在黄病毒属中高度保守。而这些关键的氨基酸能与我们的化合物产生重要的相互作用。首先把 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物进行 XP 对接,对接的结合能为-4.691 kcal/mol,且发现它能很好地重复 Strelkov 教授论文^[17]中的结果,即主要氨基酸的氢键长度均与核磁数据一致(图 3A),证明了本研究对接参数设置的准确性;但由于其分子较小,因此,无法与关键氨基酸 Arg439、Asn569 发生明显的相互作用。而最终进入 XP 对接的化合物结合能分布为-1.500 ~ -9.866 kcal/mol,因此本研究取优于 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物的结果进行分析(即结合能大于-4.691 kcal/mol),且对口袋的关键氨基酸有重要的相互作用;由于篇幅有限,本文中仅选取最具有结构代表性的 5 个化合物进行对接分析(如图 3 与附录表 S1)。



(A) 化合物 siteA-1 (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用; (B) 化合物 Divanchrobactin (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用; (C) 化合物 Bromophenol (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用; (D) 化合物 2-hydroxy-1'methylzeatin (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用; (E) 化合物 Garveatin E (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用; (F) 化合物 2-hydroxy-6-methylaminopurine (绿色) 与口袋 A 的氨基酸 (灰色) 相互作用。

图 3 海洋天然产物与寨卡病毒 NS3 解旋酶口袋 A 的分子对接分析

Fig. 3 Molecular docking analyses of marine natural products towards the binding Site A of NS3 Helicase of Zika virus

1) Divanchrobactin (MNPD001378): 该化合物为棕黄色油状物, 由波兰的 Alison Butler 教授于 2010 年报道^[22], 主要从海洋弧菌 DS40M4 分离得到, 目前尚无报道有生物学活性。通过 XP 计算, Divanchrobactin 的结合能为 - 9.866 kcal/mol, 远大于碎片分子 H-嘌呤-2,6-二胺化合物 (- 4.691 kcal/mol); 原因可能是该分子类似于四肽分子, 分子量和体积较大, 官能团丰富, 能与口袋 A 表面结合位点的氨基酸存在较多的相互作用 (图 3B), 如: 两个精氨酸侧链和丝氨酸侧链能与 NS3-解旋酶口袋 A 的 Cys600、Asn568、Asn569、Thr570、Ile571 和 Met572 等主链酰胺键存在不同程度的相互作用, 这与 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物的相互作用很类似但更丰富。除此之外, 其首尾的苯二酚结构还能与 Ser365 的侧链羟基形成 2.93 Å 的强氢键, 能与 Ala443 的酰胺键形成 2.71 Å 的强氢键, 同时苯环区域还能与口袋 A 保守的关键的疏水氨基酸 Ile441 等形成疏水相互作用等。这正是

Divanchrobactin 获得额外结合能的主要原因。

2) Bromophenol (MNPD005219): 是白色针状物为含溴多酚类化合物, 由我国科学家于 2003 年从红藻中提取分离得到^[23]。该化合物含有 5 个溴原子, 是海洋天然产物的一个典型特征; 目前该类化合物报道有降糖及抗肥胖作用^[24]。该化合物与 NS3 解旋酶的结合能为 -6.661 kcal/mol, 其中主要的相互作用为 5 个酚羟基均与氨基酸主链形成较好的氢键作用, 而 5 个溴原子对结合能的作用不明显。与 Divanchrobactin 不同的是, 其中一个溴原子能与 SiteA 关键氨基酸 Arg439 的胍基有较好的接触, 这可能类似于同主族的氟原子有类氢键的相互作用(图 3C)。, 与此同时, 该化合物还与保守氨基酸 Ala597 及 Ile571 也具有好的疏水疏水相互作用。

3) 2-Hydroxy-1'methylzeatin (MNPD000865): 细胞分裂素来源于绿藻^[25, 26], 其结构较小, 与碎片分子 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物具有相同的母核, 因此, 结合方式也与其非常类似。由于 Cytokinin 五元环上缺少氨基, 因此, 它的羟基代替氨基与 Cys600 及 Met572 的羰基形成较好的氢键相互作用(键长分别为 3.86 Å 和 2.79 Å); 五元环上的两个氢键跟 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物几乎一致。不同的是, Cytokinin 的烯丙位的羟基与 Leu442 的羰基形成额外的氢键(2.66 Å), 这也是 Cytokinin 稍优于 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物的原因(图 3D)。此外, 该化合物还与关键氨基酸 Ala597 及 Ile571 形成好的疏水疏水相互作用。

4) Garveatin E (MNPD002933): 于 2006 年从东北太平洋海洋水螅体中分离得到, 并被证明是 IDO 的抑制剂。该化合物是三环结构, 且没有氮原子的存在, 这大大削弱了类似于 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物的氢键相互作用方式所以其结合能不强(-5.211 kcal mol⁻¹); 其作用模式主要是利用母核上的羰基与羟基分别与 Arg439 的胍基、Met572 和 Asn569 的酰胺键形成强氢键; 与此同时, 三环结构能与疏水的 Cys600、Ala597、Met595、Ile571 及 Ile441 发生相互作用从而促进 Garveatin E 与 NS3 解旋酶的结合(图 3E)。

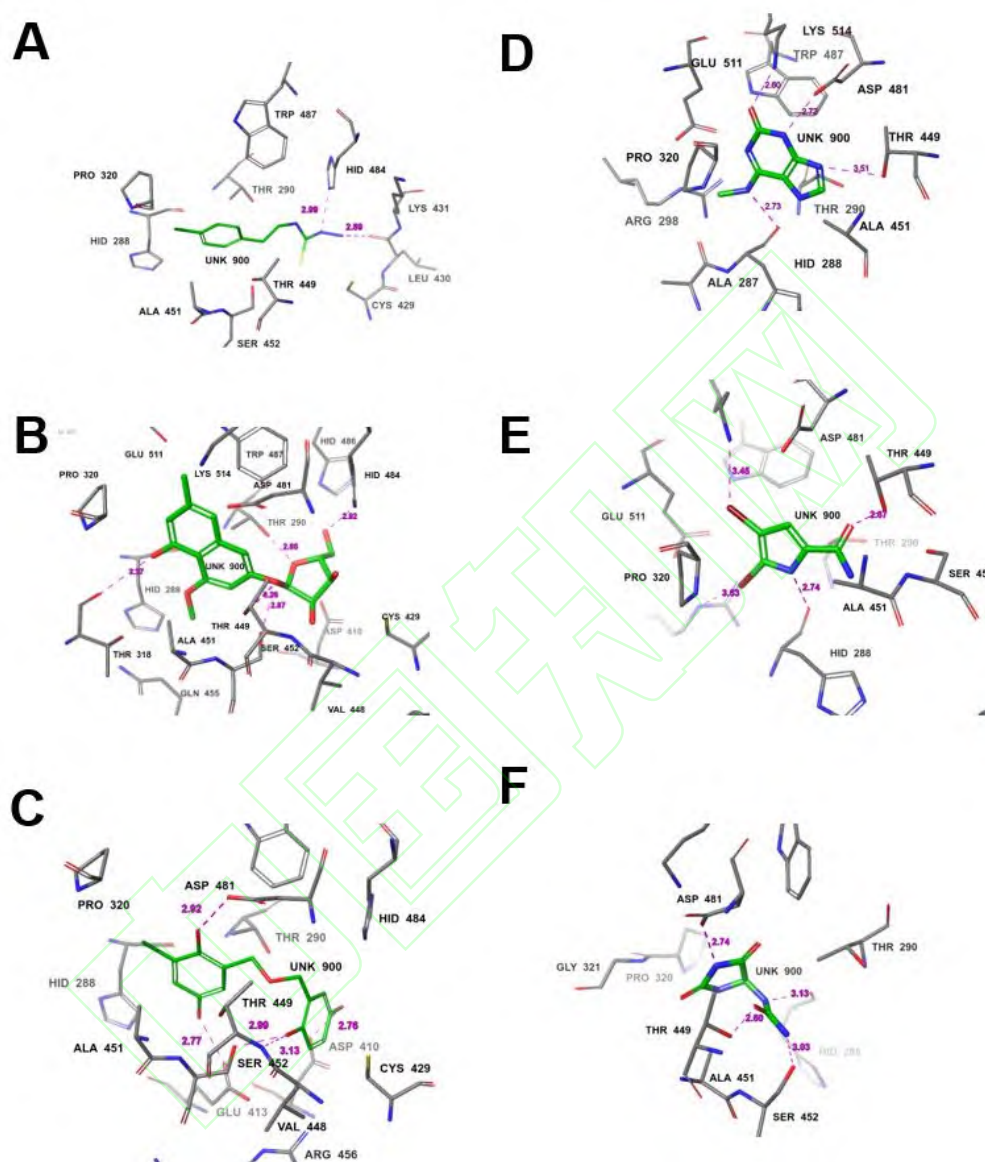
5) 2-Hydroxy-6-methylaminopurine (MNPD000958): 属于细胞分裂素的一种^[27]。与 2-hydroxy-1'methylzeatin 及 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物结构很类似, 目前它被开发为 AMPK 的激动剂, 用于治疗代谢性疾病。其结合能几乎与 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物持平, 而且结合方式分析表明: 两者的氢键相互作用几乎一样, 而此化合物 2 位羟基由于氢键的饱和性, 只能与 Met272 形成单氢键, 而难于跟 Cys600 的酰胺基再形成氢键。还有一处不同的是, 6 位氨基的甲基化可能与保守且重要的 Ala597 有疏水相互作用会稍微改善下结合能, 因为它附近无氢键受体能与之相互作用, 而杂芳香环可与保守的 Ile571 也发生疏水相互作用从而增强其结合活性(图 3F)。

综上, 共剖析了 5 个海洋天然产物在口袋 A 的相互作用, 由于口袋 A 口袋的可开放性, 它能容忍分子量大的小分子存在; 而该口袋主要通过氢键网络来维持配体的相互作用, 且这些相互作用在 5 个海洋天然产物都较为保守, 与 Strelkov 教授的论文报道^[17]类似; 因此, 这些证据表明这 5 个化合物可能是寨卡病毒 NS3 解旋酶的配体。

2.2 基于口袋 B 的虚拟筛选结果分析

跟口袋 A 完全不同, 口袋 B 的结合口袋深埋在蛋白内部且空间狭长, 且位于 NS3 解旋酶 3 个结构域的交界处(图 2)。但与 RNA 结合位点又有差别。奇特的是该结合位点的氨基酸呈疏水区(Thr316、Val191、Ala287、Phe314、Tyr508 及 Trp487)及亲水区(His288、Glu413、Ser452、Thr449 及 Gln455)两极分布, 且在人类所有的黄病毒属(如登革热病毒、昆津病毒、谷脑炎病毒等)中高度保守, 暗示着口袋 B 是非常重要的影响 NS3 解旋酶结构与功能的结合口袋。这也与 Strelkov 教授的论文中 N-(4-氯乙基)胍甲酰胺的分子结构呈现正相关。基于 Sitemap 的口袋成药性分析表明: 对于优化后的 NS3 解旋酶, 口袋 B 具有比口袋 A 更好的成药性。Sitescore 作为判断药物结合与不结合的重要依据, 默认为大于 0.8 就可以作为药物结合的口袋; 口袋 B 的计算值为 1.14, 大于 1, 暗示着该处是一个强有力的药物结合口袋。而作为成药性与非成药性的 Dscore 参数, 口袋 B 也达到了 0.96, 也满足了口袋成药性的要求。研究表明: 我们把该化合物进行重新对接分析(redock), 其结合能为 -5.070 kcal/mol, 稍优于 9H-嘌呤-2,6-二胺化合物在口袋 A 的结合能。其结合

方式主要靠疏水的苯环区域及极性末端与极性氨基酸的相互作用；而最近进入 XP 对接的化合物结合能分布为-1.628 ~ -8.401 kcal/mol，所以本研究取优于 N-（4-氯乙基）胍甲酰胺化合物的结果进行分析（即结合能大于- 5.070 kcal/mol），且对口袋的关键氨基酸有重要的相互作用；由于篇幅有限，本文中也仅选取最具有结构代表性的 5 个化合物进行对接分析（图 4 与表 S2）。



（A）化合物口袋 B-3（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图；（B）化合物 aromatic polyketides（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图；（C）化合物 dimeric terrestrols（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图；（D）化合物 6-(methylamino)-3,7-dihydro-2H-purin-2-one（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图；（E）化合物 4,5-dibromopyrrole-2-carbonamide（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图；（F）化合物 2-R-allantoin（绿色）与口袋 B 的氨基酸（灰色）相互作用图。

图 4 海洋天然产物与寨卡病毒 NS3 解旋酶口袋 B 的分子对接分析

Fig. 4 Molecular docking analyses of marine natural products towards the binding Site B of NS3 Helicase of Zika virus

1) Aromatic polyketides (MNPD001827)：是黄色针状物，为芳香聚酮类化合物，是我国科学家于 2008 年从海洋真菌白曲霉中分离得到^[28]。该类化合物有一个芳香性的疏水双环，同时以糖环作为极性头结尾，这样的结构跟 N-（4-氯乙基）胍甲酰胺化合物很类似，这也是它为什么打分值最合理的原因（-8.401 kcal/mol）；相互作用分析表明：芳香环能与口袋 B 的关键氨基酸如 Pro320 和 His288

等存在疏水相互作用；与此同时，芳香环的羟基能跟 Thr318 主链的羰基形成 3.37 Å 的中等强度的氢键；而五元糖环能与 Thr449 和 Ser452 等关键氨基酸发生至少四个氢键；正是这么多的相互作用才使这个 Aromatic polyketide 化合物在口袋 B 对 NS3 解旋酶具有很强的结合能力（图 4B）。

2) Dimeric Terrestrols (MNP001354)：是我国科学家于 2008 年从海洋真菌青霉菌中分离得到^[29]，其分子结构特征与 N-(4-氯乙基)肼甲酰胺化合物也类似，但结合能比较好（- 6.821 kcal/mol）。其苯环上的四个羟基均能与口袋的关键极性氨基酸（如 Glu413 和 Ser452 等）形成强氢键（氢键距离为 2.76 ~ 3.13 Å）；这与 Aromatic polyketides 相当（图 4C），但由于疏水作用对象由萘环变为苯环，导致了该部分的贡献值降低，这也是它结合能值低于 Aromatic polyketides 的根本原因。

3) 6-(Methylamino)-3,7-dihydro-2H-purin-2-one (MNP005912)：可以看做是 2-hydroxy-6-methyl aminopurine 的互变异构体。此化合物在口袋 B 的结合能却比口袋 A 要好 1.6 kcal mol⁻¹。说明此化合物可以选择性地结合到口袋 B 而不是口袋 A。此类化合物虽然分子量较小，但相互作用分析表明它与口袋 B 的关键且保守极性氨基酸（如 Thr449 和 His288 等）可产生 5 个强氢键作用（图 4D），远远超过口袋 A 的三个氢键。此外，口袋 B 的芳香性氨基酸 Trp487 能与此分子五六元环存在 Pi-Pi 堆积作用。这也时它具有结合位点偏好性的根本原因。而化合物 4,5-dibromopyrrole-2-carbonamide（如图 4E：MNP000526）虽具有芳香性基团，但由于 Br 原子参与形成氢键的能力较弱，因此，其结合能弱于 6-(methylamino)-3,7-dihydro-2H-purin-2-one；而 R-allantoin 化合物（图 4F：MNP001587）虽然能有氢键给体与受体能力，但是分子没有芳香性且分子体积较小，无法够及于极性氨基酸相互作用的程度，这也是它结合能弱的本质原因。

综上，口袋 B 的虚拟筛选结果表明：此口袋偏好芳香性官能团及氢键给体与受体官能团。同时口袋 B 的口袋属于隧道形结构，因此，无法容纳分子体积较大的分子的存在；这也是它跟具有表面结合性质的口袋 A 不一样的地方。

2.3 筛选化合物的 ADMET 预测与分析

最后对上述 10 个海洋天然产物进行药物的吸收、分配、代谢、排泄和毒性（ADMET）的预测分析（表 1）。结果表明：大部分化合物能满足成药性的各项指标要求，如经典的成药五规则（donor HB、acceptHB、SASA 及 PSA 等）、药物代谢能力评价#metab、药物透皮吸收能力评价 QPPCaco 以及药物心脏毒性 QPlogHERG 等；但 Divanchrobactin (MNP001378) 的成药性偏差，有三条违反成药五原则；其属于拟四肽，氢键给体与受体偏多，且在代谢过程中极有可能发生代谢反应，口服吸收利用率低。虽然它能很好地结合口袋 A，但从成药性来看反而不是最佳的化合物。而口袋 B 最好的化合物 MNP001827 也具有 HERG K⁺通道阻断的风险，可能具有一定的心脏毒性。MNP001587 的 QPPCaco 的值低于 25，暗示着说该化合物经过肠道吸收是不好的。而另外两个化合物 MNP000526 与 MNP004936 的肠道吸收指标都很好（QPPCaco > 500），这也跟它们对应的口服吸收度（80.26% 与 89.29%）正相关。

表 1 海洋天然产物的成药性评估

Tab. 1 Prediction and Evaluation of the druggability of marine natural products

编号	#stars	#rotor	SASA	Donor HB	acceptHB	QPlogPo/w	QPlogS
Normal	0~5	0~15	300~1000	0~6	2~20	-2~6.5	-6.5~0.5
MNP001378	13	28	1157.932	12	16.7	-0.672	-3.635
MNP005219	2	10	672.983	6	4.5	3.578	-5.376
MNP000865	0	6	510.297	4	5.7	0.509	-2.553
MNP002933	0	3	592.282	1	6.5	2.091	-4.245
MNP004711	0	0	414.265	4	6	-0.505	-2.215
MNP000958	0	2	358.332	3	4	-0.163	-1.713
MNP001827	0	8	602.368	4	9.05	0.658	-2.988
MNP001354	0	8	524.507	4	4.7	1.458	-2.871
MNP005912	1	1	356.514	3	5.5	-0.372	-1.64
MNP000526	0	1	348.252	3	2.5	0.824	-1.988
MNP001587	5	1	294.822	3.25	3.75	-2.018	0.186
MNP004936	0	2	387.476	2	4.15	1.01	-1.772

编号	QPlogHERG	QPPCaco	#metab	QPlogKhsa	PercentHumanOralAbsorption	PSA	RuleOfFive
Normal	>-5	>25	1~8	-1.5~-1.5	%	7~200	
MNPD001378	-2.98	0.001	11	-1.523	0	436.981	3
MNPD005219	-4.72	37.544	8	0.226	50.16	129.061	2
MNPD000865	-4.541	119.313	4	-0.493	67.096	106.046	0
MNPD002933	-4.138	241.515	5	0.119	81.838	112.935	0
MNPD004711	-3.328	59.594	1	-0.447	55.763	137.056	0
MNPD000958	-3.518	242.506	1	-0.658	68.674	87.939	0
MNPD001827	-5.009	168.555	6	-0.563	70.65	108.679	0
MNPD001354	-4.876	166.488	7	-0.367	75.241	90.482	0
MNPD005912	-3.42	189.898	0	-0.705	65.548	96.338	0
MNPD000526	-3.334	511.874	1	-0.579	80.26	67.233	0
MNPD001587	-0.726	18.219	2	-1.046	37.69	145.507	0
MNPD004936	-2.467	1422.403	1	-0.386	89.293	50.86	0

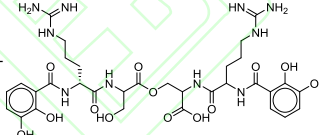
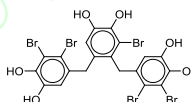
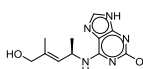
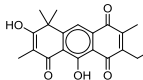


3 结论

本研究以寨卡病毒 NS3 解旋酶两个新颖的结合位点, 运用分子对接技术对自建的 5969 个海洋天然产物开展虚拟筛选, 并根据打分函数及依照结构多样性的原则, 挑选了 10 个化合物进行对接口袋的详细分析, 发现这些化合物的结合方式与报道的碎片分子是一致的, 但结合能力却有大幅的提升, 暗示着它们可能更好地靶向 NS3 解旋酶, 从而成为潜在治疗寨卡病毒病的海洋天然产物; 且初步的成药性评估表明, 除了 Divanchrobactin (MNPD001378) 外, 文中所述的海洋天然产物都满足成药性 (如成药五规则 RuleOfFive、毒性 QPlogHERG、透皮吸收 QPPCaco 及代谢#metab 等) 的要求。这些结果为后期这些化合物进行实验测试提供了理论支撑。

致谢: 感谢薛定谔公司提供的薛定谔软件套装; 海洋天然产物库由刘诗婷、杨灿原、鞠茵及王鑫构建提供, 在此一并感谢。

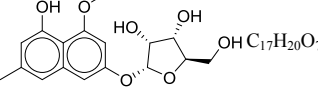
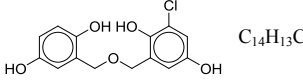
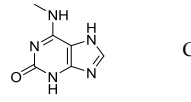
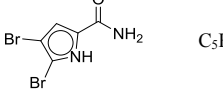
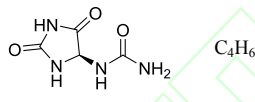
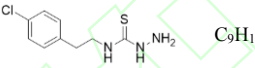
表 S1 NS3解旋酶口袋A与海洋天然产物库的虚拟筛选对接结果

Tab. S1 Virtual screening and docking results of marine natural products towards binding Site A of NS3 helicase

Entry ID	编号	名称	CAS 号	化学结构	分子式	分子量	结合能 ^a	相互作用的氨基酸残基 ^b	来源
1	MNPD001378	Divanchrobactin	1233718-16-5		C ₃₂ H ₄₄ N ₁₀ O ₁₃	776	-9.866	Ser365, Arg367, Leu430, Ile441, Leu442, Ala443, Met595, Asn568, Thr570, Ile571, Met572, Glu573, Asp574, Cys600, Ser601;	marine bacterium <i>Vibrio</i> sp. DS40M4 ^[22]
2	MNPD005219	Bromophenol	503609-18-		C ₂₀ H ₁₃ Br ₅ O ₆	743	-6.661	Leu442, Arg439, Asn568, Thr570, Ile571, Met572, Met595, Ala597, Cys600, Ser601;	the Red Alga <i>Rhodomela confervoides</i> ^[23]
3	MNPD000865	2-hydroxy-1-methylzeatin	137592-13-3		C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₂	249	-6.800	Leu442, Thr570, Ile571, Met572, Ala597, Cys600, Ser601, Ile441, Arg439, Asn568, Asn569, Thr570, Ile571, Met572, Met595, Ala597, Cys600, Ser601;	green alga ^[26, 27]
4	MNPD002933	Garveatin E	873536-71-1		C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340	-5.211	Thr570, Ile571, Met572, Met595, Ala597, Cys600, Ser601;	Northeastern Pacific Marine Hydroid <i>Garvea annulata</i> ^[30]
5	MNPD000958	2-hydroxy-6-methylaminopurine	24391-35-3		C ₆ H ₇ N ₅ O	165	-4.710	Thr570, Ile571, Met572, Met595, Ala597, Ser601;	green algae and blue coral ^[27]
6	SiteA-1	9H-purine-2,6-diamine			C ₅ H ₆ N ₆	150.1	-4.691	Thr570, Ile571, Met572, Met595;	

注: a. 对接结合能为 Glide XP 打分值, 单位为 kcal/mol; b. 显示为与药物分子结合范围为 3 Å 的氨基酸侧链残基。

表 S2 NS3解旋酶口袋B与海洋天然产物库的虚拟筛选对接结果
Tab. S2 Virtual screening and docking results of marine natural products towards binding Site B of NS3 helicase

Entry ID	编号	名称	CAS 号	化学结构	分子式	分子结合能 ^a	相互作用的氨基酸残基 ^b	来源
7	MNPD001827	aromatic polyketides	1084953-68-3		C ₁₇ H ₂₀ O ₇	336 -8.401	His288, Thr290, Thr318, Pro320, Asp410, Cys429, Val448, Thr449, Ala451, Ser452, Gln455, Asp481, His484, His486, Trp487, Glu511, Lys514	marine-derived fungus, <i>Aspergillus glaucus</i> ^[28]
8	MNPD001354	dimeric terrestrols	1005338-77-1		C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅	296 -6.821	His288, Pro320, Asp410, Glu413, Cys429, Val448, Thr449, Ala451, Ser452, Arg456, Asp481, Trp487, His484	Marine-Derived Fungus <i>Penicillium terrestre</i> ^[29]
9	MNPD005912	6-(methylamino)-3,7-dihydro-2H-purin-2-one	2439 1-35-3		C ₆ H ₇ N ₅ O	165 -6.336	Ala287, His288, Thr290, Arg298, Pro320, Thr449, Ala451, Asp481, Trp487, Lys514	green algae and blue coral ^[27]
10	MNPD000526	4,5-dibromopyrrole-2-carbonamide	34649-20-2		C ₅ H ₄ Br ₂ N ₂ O	266 -6.186	His288, Arg298, Thr290, Pro320, Thr449, Ala451, Ser452, Asp481, Trp487, Glu511, Lys514	The sponge <i>S. massa</i> ^[31]
11	MNPD001587	R-allantoin	7303-80-2		C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158 -5.670	His288, Thr290, Pro320, Gly321, Thr449, Ala451, Ser452, Asp481, Trp487, Lys514	the seacoastal plant <i>Mertensia maritima</i> ^[32]
12	Pocket B-3	N-(4-chlorophenethyl) hydrazinecarbothioamide			C ₉ H ₁₂ ClN ₃ S	229.0 -5.070	His288, Thr290, Pro320, Cys429, Leu430, Lys431, Thr449, Ala451, Ser452, His484, Trp487, Glu511	

注: a. 对接结合能为 Glide XP 打分值, 单位为 kcal/mol; b. 显示为与药物分子结合范围为 3 Å 的氨基酸侧链残基。

参考文献:

- [1] BRASIL P, PEREIRA J P, JR., MOREIRA M E, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro[J]. *New England Journal of Medicine*, 2016, 375(24): 2321-2334.
- [2] CAO-LORMEAU V-M, BLAKE A, MONS S, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study[J]. *Lancet*, 2016, 387(10027): 1531-1539.
- [3] MECHARLES S, HERRMANN C, POUILLAIN P, et al. Acute myelitis due to Zika virus infection[J]. *Lancet*, 2016, 387(10026): 1481-1481.
- [4] FURTADO J M, ESPOSITO D L, KLEIN T M, et al. Uveitis Associated with Zika Virus Infection[J]. *New England Journal of Medicine*, 2016, 375(4): 394-396.
- [5] CARTEAUX G, MAQUART M, BEDET A, et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2016, 374(16): 1595-1597.
- [6] YUAN L, HUANG X Y, LIU Z Y, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly[J]. *Science*, 2017, 358(6365): 933.
- [7] MOTTIN M, BORBA J V B, BRAGA R C, et al. The A-Z of Zika drug discovery[J]. *Drug Discovery Today*, 2018, 23(11): 1833-1847.
- [8] LEI J, HANSEN G, NITSCHKE C, et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor[J]. *Science*, 2016, 353(6298): 503-505.
- [9] LI Y, ZHANG Z, PHOO W W, et al. Structural Dynamics of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Binding to Dipeptide Inhibitors[J]. *Structure*, 2017, 25(8): 1242.
- [10] JAIN R, COLOMA J, GARC A-SASTRE A, et al. Structure of the NS3 helicase from Zika virus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23: 752-754.
- [11] COLOMA J, JAIN R, RAJASHANKAR K R, et al. Structures of NS5 Methyltransferase from Zika Virus[J]. *Cell reports*, 2016, 16(12): 3097-3102.
- [12] FATIMA M, KHAN M S, RASHID H, et al. Structure Based Virtual Screening and Molecular Docking Studies for Identification of Allosteric Inhibitors against Zika Virus Protease NS2B-NS3[J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2018, 50(5): 1709-1715.
- [13] MOTTIN M, BRAGA R C, DA SILVA R A, et al. Molecular dynamics simulations of Zika virus NS3 helicase: insights into RNA binding pocket activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 492(4): 643-651.
- [14] SAHOO M, JENA L, DAF S, et al. Virtual screening for potential inhibitors of NS3 protein of Zika virus[J]. *Genomics & Informatics*, 2016, 14(3): 104-111.
- [15] SINGH A, JANA N K. Discovery of potential Zika virus RNA polymerase inhibitors by docking-based virtual screening[J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2017, 71: 144-151.
- [16] SINIGAGLIA A, RICCETTI S, TREVISAN M, et al. In silico approaches to Zika virus drug discovery[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2018, 13(9): 825-835.
- [17] MUNAWAR A, BELEN S, MUNAWAR A, et al. Discovery of novel druggable sites on Zika virus NS3 helicase using X-ray crystallography-based fragment screening[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3664.
- [18] GERWICK W H, MOORE B S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(1): 85-98.

- [19] BLUNT J W, COPP B R, MUNRO M H G, et al. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(2): 196-268.
- [20] MOLINSKI T F, DALISAY D S, LIEVENS S L, et al. Drug development from marine natural products[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 8(69).
- [21] LI L, WANG J, JIA Z, et al. Structural view of the helicase reveals that Zika virus uses a conserved mechanism for unwinding RNA[J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2018, 74(4): 205-213.
- [22] SANDY M, HAN A, BLUNT J, et al. Vanchrobactin and anguibactin siderophores produced by *Vibrio* sp. DS40M4[J]. J Nat Prod, 2010, 73(6): 1038-1043.
- [23] FAN X, XU N J, SHI J G. Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides*[J]. J Nat Prod, 2003, 66(3): 455-458.
- [24] FAN X, MA C, HAN L, et al. Extraction of bromophenol compounds from red algae and their uses in the treatment of diabetes and obesity: CN1853618A[P]. 2006-11-01.
- [25] FUJII T, OHBA M, KAWAMURA H, et al. Purines. LV. Syntheses and cytokinin activities of some adenine and adenosine derivatives related to 1'-methylzeatin[J]. Chem Pharm Bull, 1993, 41(8): 1362-1365.
- [26] FUJII T, OHBA M, HANEISHI T, et al. Synthesis and absolute configuration of the green alga cytokinin 2-hydroxy-1'-methylzeatin[J]. Heterocycles, 1992, 34(1): 21-24.
- [27] FAROOQI A H A, SHUKLA Y N, SHUKLA A, et al. Cytokinins from marine organisms[J]. Phytochemistry, 1990, 29(7): 2061-2063.
- [28] DU L, ZHU T, LIU H, et al. Cytotoxic polyketides from a marine-derived fungus, *Aspergillus glaucus*[J]. J Nat Prod, 2008, 71(11): 1837-1842.
- [29] CHEN L, FANG Y, ZHU T, et al. Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*[J]. J Nat Prod, 2008, 71(1): 66-70.
- [30] PEREIRA A, VOTTERO E, ROBERGE M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors from the Northeastern Pacific marine hydroid *Garveia annulata*[J]. J Nat Prod, 2006, 69(10): 1496-1499.
- [31] TASDEMIR D, MALLON R, GREENSTEIN M, et al. Aldisine alkaloids from the philippine sponge *Stylissa massa* are potent inhibitors of mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK-1)[J]. J Med Chem, 2002, 45(2): 529-532.
- [32] FEDOREYEV S A, INYUSHKINA Y V, BULGAKOV V P, et al. Production of allantoin, rabsosin and rosmarinic acid in callus cultures of the seacoastal plant *Mertensia maritima* (Boraginaceae)[J]. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 2012, 110(1): 183-188.
- [33] 管华诗, 王曙光. 中华海洋本草-海洋天然产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.